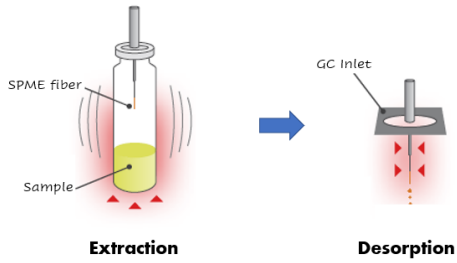
การเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการสกัดแบบ Trap-Based Preconcentration

ผู้จัดทำ : รติมาศ บุญล้อม

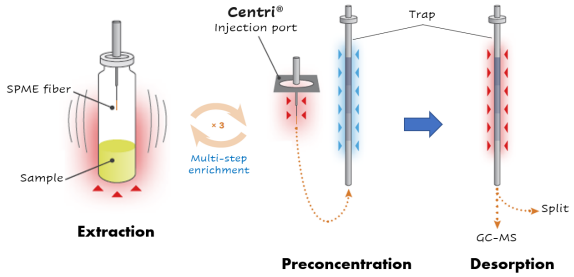
บทนำ

เทคนิคการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์กลิ่นในอาหารและเครื่องดื่ม ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับขนาดเล็ก (Solid Phase Micro Extraction, SPME) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้งานง่าย ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอันตรายในการสกัด โดยมีขั้นตอนการทำงานดังแสดงในรูปที่ 1 แต่เทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดในเรื่องช่วงของความเป็นเส้นตรง (Linear Range) เนื่องจากความสามารถในการดูดซับของไฟเบอร์มีจำกัด และการให้ความร้อนเพื่อชะสาร (Desorption) เข้าสู่ระบบแก๊สโครมาโตกราฟเป็นไปอย่างช้าๆ ทำให้โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์มีพีกที่มีลักษณะฐานกว้าง (Broad Peaks)



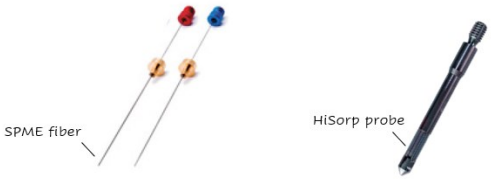
รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค SPME

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่าง เพื่อลดข้อจำกัดของเทคนิค SPME สามารถทำได้โดยการเพิ่มความเข้มข้น ร่วมกับระบบการให้ความร้อนอย่างรวดเร็วในการชะสารเข้าสู่ระบบ GC ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ได้อย่างดีเยี่ยม เรียกเทคนิคนี้ว่า SPME–trap โดยเทคนิคนี้จะมีขั้นตอนการทำงานคล้ายเทคนิค SPME เดิมแต่จะเพิ่มขั้นตอนการดูดซับเป็น 2 ขั้นตอน คือดูดซับผ่าน SPME fiber และ นำมาดูดซับไว้ที่ trap โดยสามารถทำขั้นตอนนี้ซ้ำได้หลายครั้งเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร ก่อนจะให้ความร้อนอย่างรวดเร็วเพื่อชะสารเข้าสู่ระบบ GC ดังแสดงขั้นตอนการทำงานในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค SPME-trap

นอกเหนือจากเทคนิค SPME-trap แล้วยังสามารถพัฒนาต่อยอด เพื่อให้ประยุกต์ใช้กับตัวอย่างที่มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น และเพิ่มความไว (Sensitivity) ในการวิเคราะห์ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับที่มีความสามารถสูงกว่า เรียกเทคนิคนี้ว่าการสกัดด้วยตัวดูดซับที่มีความสามารถสูงหรือ HiSorb (High-capacity Sorptive extraction) ซึ่งเป็นการสกัดที่มีขั้นตอนการทำงานเช่นเดียวกับเทคนิค SPME หรือ SPME-trap แต่แตกต่างกันที่ลักษณะและปริมาณของตัวดูดซับที่ใช้ โดยเทคนิค Hisorb ตัวดูดซับจะถูกเคลือบอยู่บน probe ซึ่งมีปริมาณของตัวดูดซับประมาณ 65 ไมโครลิตร ส่วน SPME ตัวดูดซับจะเคลือบบนไฟเบอร์ซึ่งปริมาณตัวดูดซับประมาณ 0.5 ไมโครลิตร ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของ SPME fiber เปรียบเทียบกับ Hisorb probe

บทความนี้แสดงการทดสอบการสกัดสารให้กลิ่นในตัวอย่างน้ำชาที่มีการเติมสารมาตรฐาน โดยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค SPME, SPME-trap, SPME–trap with multi-step enrichment และ Hisorp-trap ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์และแสดงประสิทธิภาพของการสกัดด้วยเทคนิคต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร รายการดังแสดงในตารางที่ 1

No.	Compound	t_R (min)	Quant ion (m/z)	log $K_{o/w}$
A	6-Chloro-o-cresol (6-COC)	36.8	107	2.70
B	2-Chlorophenol	39.6	128	2.16
C	2-Bromophenol	43.7	172	2.40
D	2,6-Dichlorophenol	48.5	162	2.80
E	2,4-Dichlorophenol	50.3	162	2.80
F	2,6-Dibromophenol	56.1	252	3.29
G	2,4,6-Trichlorophenol	56.4	196	3.44
H	4-Chlorophenol	58.0	128	2.16
I	2,4-Dibromophenol	58.6	252	3.29

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างใบชา 1 กรัมใส่ขวดขนาด 20 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร
3. เติมสารมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ปิดฝาให้แน่น

อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องมือ : Centri® ผลิตภัณฑ์ Markes International ประเทศสหราชอาณาจักร

1. SPME and SPME–trap:

Fiber: DVB/CAR/PDMS,20mm long, 50/30 µm df

Sampling depth: 30 mm

Incubation: 60°C (15 min) at 500 rpm

Desorption: 250°C (3 min)

Enrichment: สำหรับการทำ Multi-step Enrichment นั้นจะมีการทำ Incubation และ Desorption เพิ่มเติมอีกสองรอบด้วยการใช้ไฟเบอร์อันเดิม

2. Headspace HiSorb :

Probe: Short-length stainless-steel HiSorb™ probe

Incubation: 60°C (60 min) at 500 rpm

Desorption: 270°C (10 min)

3. Preconcentration:

Flow path: 180°C

Focusing trap: 'Material emissions'

Purge flow: 50 mL/min (1 min)

Trap low: 25°C

Trap high: 290°C (3 min)

Split ratio: 6 : 1

4. GC–MS:

Column: DB-WAX™ Ultra Inert (Agilent Technologies), 60 m × 0.25 mm × 0.25 µm

Oven program: 40°C (3 min), then 30°C/min to 60°C, then 3°C/min to 230°C (15 min)

Constant flow: 1 mL/min helium

Transfer line: 230°C

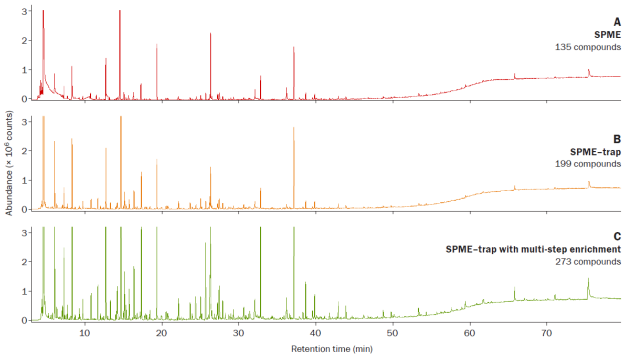
Ion source: 230°C

Mass range: m/z 35–300

รูปที่ 4 แสดงเครื่อง Centri® Automated Extraction and Enrichment

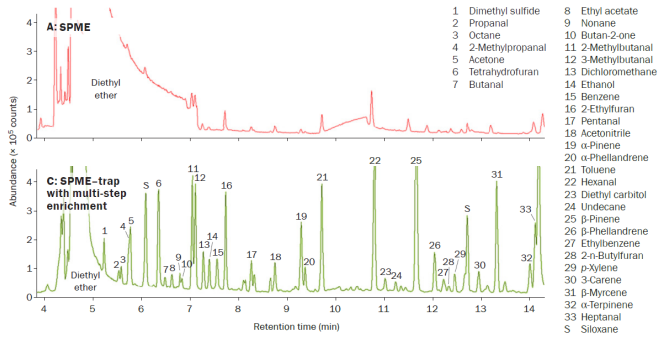
ผลการวิเคราะห์

การเปรียบเทียบความไว (Sensitivity) ในการวิเคราะห์ระหว่างการสกัดด้วยเทคนิค SPME, SPME-trap และ SPME–trap with multi-step enrichment โดยพิจารณาจากจำนวนสารที่สามารถตรวจวัดได้ พบว่าเทคนิคที่มีความไวสูงสุดคือเทคนิค SPME–trap with multi-step ที่สามารถตรวจวัดสารได้มากถึง 273 สาร ลำดับถัดมาคือเทคนิค SPME-trap ที่สามารถตรวจวัดสารได้ 199 สารและลำดับสุดท้ายเทคนิค SPME สามารถตรวจวัดสารได้ 135 สาร ดังแสดงในรูปที่ 5



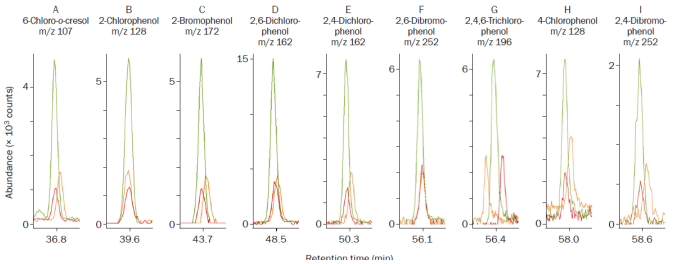
รูปที่ 5 โครมาโตแกรมเปรียบเทียบระหว่างการการสกัดด้วยเทคนิค SPME(A) SPME-trap(B) และ SPME–trap with multi-step(C)

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะพีกของสาร ที่พบได้ในช่วงแรกของโครมาโตแกรม พบว่าการสกัดด้วยเทคนิค SPME–trap with multi-step ช่วยลดการเกิด broad peaks ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งทำให้การสกัดด้วยเทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจวัดสารที่ซ้อนทับกันได้ง่ายขึ้น และสามารถอินทิเกรตเพื่อทำผลได้ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้นอีกด้วย

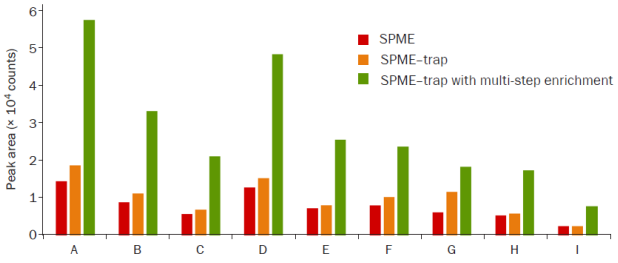


รูปที่ 6 โครมาโตแกรมเปรียบเทียบระหว่างการการสกัดด้วยเทคนิค SPME(A) และ SPME–trap with multi-step(C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะของพีก และขนาดสัญญาณในรูปแบบพื้นที่ใต้กราฟ ของสารมาตรฐานที่ตรวจวัดได้ พบว่า เทคนิค SPME–trap with multi-step เป็นเทคนิคที่ให้ขนาดพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานสูงสุด ถัดมาคือเทคนิค SPME-trap และ SPME ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8

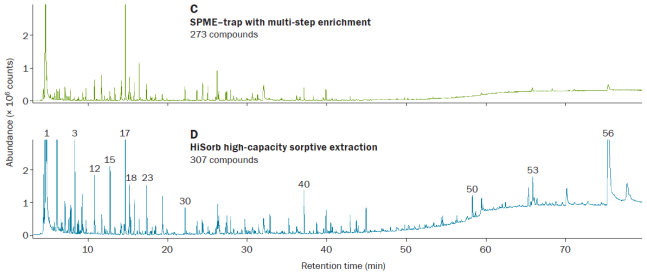


รูปที่ 7 เปรียบเทียบขนาดสัญญาณของสารมาตรฐานที่สกัดด้วยเทคนิค SPME(—) SPME-trap(—) และ SPME–trap with multi-step(—)



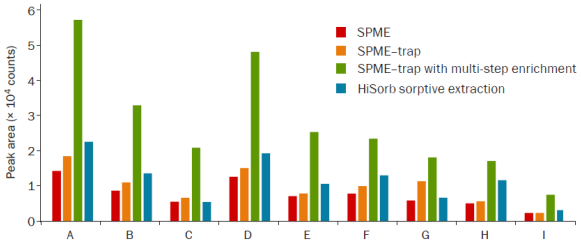
รูปที่ 8 เปรียบเทียบขนาดสัญญาณของสารมาตรฐานที่สกัดด้วยเทคนิค SPME, SPME-trapและ SPME–trap with multi-step

จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SPME, SPME-trap และ SPME–trap with multi-step enrichment พบว่าเทคนิค SPME–trap with multi-step enrichment เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูงสุด จึงนำเทคนิคนี้ไปเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยเทคนิค Hisorb-trap เพิ่มเติมโดยดูจากจำนวนสารที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค HiSorb มีมากถึง 307 สารดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 โครมาโตแกรมเปรียบเทียบระหว่างการการสกัดด้วยเทคนิค SPME–trap with multi-step(C) และ Hisorb(D)

แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานที่ตรวจวัดได้ พบว่าเทคนิค SPME–trap with multi-step enrichment ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานสูงกว่าเทคนิค HiSorb ดังแสดงในรูปที่ 10 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากตัวดูดซับของ SPME เป็นชนิด multiple phases DVB/CAR/PDMS ที่มีความมีขั้วหลากหลายมากกว่าตัวดูดซับของ HiSorb ซึ่งเป็น Single phase ชนิด PDMS ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่ไม่มีขั้ว จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการดูดซับสารมาตรฐานซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีขั้ว ได้น้อยกว่า แต่ในทางกลับกัน Hisorb จะสามารถสกัดสารกลุ่มไม่มีขั้วได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ SPME–trap with multi-step enrichment นั่นเอง



รูปที่ 10 เปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานที่สกัดด้วยเทคนิค SPME SPME-trap, SPME–trap with multi-step และ Hisorb

สรุปผล

เทคนิค SPME-trap เป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารก่อนการวิเคราะห์และลดการเกิด broad peaks ของผลการวิเคราะห์ ช่วยให้มีความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้นเมื่อเทียบกับเทคนิค SPME

เทคนิค SPME–trap with multi-step enrichment เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพเหนือ SPME-trap ในเรื่องของความไวในการวิเคราะห์ ช่วยเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ให้มากยิ่งขึ้นและสามารถรองรับการวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลากหลายชนิด เนื่องจากมีตัวดูดซับให้เลือกใช้หลากหลายชนิดมากกว่าเทคนิค HiSorb

เทคนิค Hisorb เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงเช่นเดียวกับเทคนิค SPME–trap with multi-step enrichment เพียงแต่ชนิดของตัวดูดซับยังมีให้เลือกใช้ไม่หลากหลายเท่า แต่ก็จะสามารถพัฒนาเพิ่มเติมได้ในอนาคต และ Hisorb probe ยังมีความแข็งแรงมากกว่าเมื่อเทียบกับ SPME fiber ทำให้ Hisorb สามารถรองรับการสกัดที่ต้องการใช้ปริมาณตัวอย่างมากๆ หรือจุ่มลงในตัวอย่างโดยตรง เพื่อสกัดก็สามารถทำได้ดีกว่าเทคนิค SPME

อย่างไรก็ดี เทคนิคการสกัดดังที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น เครื่องเตรียมตัวอย่างอัตโนมัติรุ่น **Centri®** Automated Extraction and Enrichment ก็สามารถเลือกใช้ได้ทั้งหมดและทุกเทคนิค ก็เป็นระบบอัตโนมัติแบบ Full system ทำให้สะดวกต่อการใช้งาน รองรับการวิเคราะห์ให้ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบ และรองรับงานวิจัยที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการได้อีกด้วย

ติดตามแอพพลิเคชั่นอื่น ๆ ได้ที่ https://www.scispec.co.th

บริษัท ซายน์ สเปค จำกัด
10 กาญจนาภิเษก ซอย 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02-454-8533

/scispec
@scispec

ThermoFisher SCIENTIFIC